

THESE

présentée à :

l'U.E.R. des Sciences Exactes et Naturelles de l'Université de Clermont II
en vue de l'obtention du grade de :

DOCTEUR ES SCIENCES

(BIOPHYSIQUE)

par

Michel DOLY

MAITRE ES SCIENCES PHYSIQUES

PHARMACIEN, ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX

△▽△▽△

Sujet de la Thèse :

Mécanisme de Formation des Phosphènes provoqués par les Rayons X

Soutenue publiquement le 9 Juin 1978 ,
devant la Commission d'Examen

△▽△▽△

Président : Monsieur **D.B. ISABELLE** Professeur

Examineurs : Monsieur **R. CHEVALIER** Maître de Conférence

Monsieur **G. MEYNIEL** Professeur,
Doyen de la Faculté de Médecine
Université de Clermont I

Monsieur **G. LAUSTRIAT** Professeur U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques
Université Louis Pasteur, Strasbourg

Monsieur **R. ALFIERI** Professeur Faculté de Médecine
Université de Clermont I

Madame **G. GAILLARD** Professeur Faculté de Pharmacie
Université de Clermont I



RESUME D'UNE THESE

Sujet : Mécanisme de formation des phosphènes provoqués
par les rayons X.

Le terme de phosphènes désigne toute sensation lumineuse perçue en absence de stimulation directe de l'oeil par la lumière visible, c'est-à-dire par des photons de longueur d'onde comprise approximativement entre 400 et 750 nm.

A la fin du 19ème siècle, peu après la découverte des rayons X, ROENTGEN, lui-même, rapporte qu'il est possible d'induire des sensations lumineuses en irradiant l'oeil d'un sujet placé à l'obscurité. Ces phosphènes, provoqués par les rayons X, ont été étudiés de manière très qualitative jusque vers 1910. Puis, les travaux sur ce sujet deviennent rares, les expérimentateurs prenant conscience des risques radiobiologiques liés à des irradiations importantes et renouvelées. Il faut alors attendre les années 1950 pour trouver, dans la littérature, des études électrophysiologiques fondamentales ayant trait à ce sujet et réalisées sur l'animal.

Ces phosphènes, obtenus avec les rayons X, suscitent un nouvel intérêt lorsqu'en 1969 un des membres de l'équipage du vol APOLLO 11 révèle, à son retour de mission, avoir perçu des éclairs lumineux. La N.A.S.A. ("National Aeronautics and Space Administration") prévoit alors des séances d'étude systématique consacrées à la genèse des phosphènes lors des vols APOLLO suivants, de la mission SKYLAB-4 et du vol APOLLO-SOYOUZ. Les résultats de ces études peuvent se résumer ainsi :

- Les phosphènes ne sont perçus qu'après adaptation pratiquement totale des observateurs à l'obscurité.
- Selon leur forme, il est possible de regrouper les phosphènes en trois catégories : les étoiles (66 % des cas), les stries lumineuses (25 % des cas) et les nuages lumineux (8 à 9 % des cas).
- Enfin, il existe une corrélation étroite entre le nombre de phosphènes perçus et le flux de particules du rayonnement cosmique rencontrées par les astronautes.

Parallèlement à ces observations dans l'espace, des expériences sont réalisées en laboratoire dans le but de confirmer le rôle des particules du rayonnement cosmique dans la genèse des phosphènes perçus par les astronautes. Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

- Il est possible de reproduire, au sol, des sensations lumineuses identiques à celles décrites par les astronautes à l'aide de particules accélérées telles que : muons, pions, neutrons ou ions lourds.
- L'adaptation totale à l'obscurité de l'observateur est indispensable à la perception de ces phosphènes.
- Il est, enfin, nécessaire que les particules incidentes rencontrent la rétine : aucun phosphène n'est perçu par irradiation directe soit du nerf optique soit du cortex visuel.

La confrontation de ces résultats obtenus en laboratoire aux données recueillies aux cours des vols spatiaux permet d'affirmer d'une part que les particules du rayonnement cosmique sont effectivement responsables des phosphènes perçus par les astronautes et d'autre part que deux mécanismes peuvent être évoqués pour expliquer ces sensations lumineuses : soit celui d'un effet CERENKOV, dû aux particules chargées du rayonnement cosmique, avec émission de lumière visible au voisinage immédiat de la rétine ; soit celui d'une interaction directe des particules incidentes avec la rétine, se traduisant par l'excitation des cellules photoréceptrices.

Si, d'après une estimation théorique, la fréquence des effets CERENKOV dûs aux particules du rayonnement cosmique est compatible avec le nombre de phosphènes perçus par les astronautes, par contre les expériences réalisées au sol établissent formellement que des particules d'énergie insuffisante pour donner lieu à un effet CERENKOV dans l'oeil sont capables de provoquer des sensations lumineuses. Dans ces conditions, l'effet CERENKOV n'est certainement pas le mécanisme principal conduisant à la perception de phosphènes par les astronautes. Un deuxième processus doit donc intervenir qui pourrait être une interaction directe du rayonnement incident avec les structures photoréceptrices de la rétine. C'est pour expliciter les modalités de cette interaction que nous avons entrepris une étude du mécanisme de formation des phosphènes provoqués par les rayons X.

Une première étude expérimentale a été réalisée sur rétine isolée, maintenue en survie. Nous avons choisi de travailler sur des rétines de rat albinos car elles ne contiennent pratiquement que des bâtonnets, cellules photoréceptrices responsables de la vision nocturne ou scotopique. Cet animal nous a donc paru particulièrement bien adapté

à l'étude des phosphènes provoqués par les rayons X dont la perception est conditionnée à l'adaptation à l'obscurité.

L'animal est adapté à l'obscurité pendant au moins deux heures. Il est sacrifié, sa rétine est disséquée et montée comme une membrane dans une cellule de perfusion. Cette cellule comprend une partie principale sur laquelle viennent s'emboîter deux capots transparents à la lumière et qui portent deux électrodes d'argent reliées à un amplificateur-enregistreur. La rétine est perfusée par un milieu enrichi placé à 37° C et dans lequel barbotte un mélange de 95 % d'oxygène et de 5 % de gaz carbonique.

Lorsque la rétine est stimulée en lumière blanche (~ 1 ms), nous recueillons la variation de potentiel transrétinien, c'est-à-dire un électrorétinogramme (E.R.G.) de rétine isolée. Ce signal électrique est biphasique et comporte une onde a négative qui n'apparaît que pour des intensités de stimulation suffisantes, suivie d'une onde b ample et positive dont l'amplitude augmente avec l'intensité du stimulus.

Nous avons étudié la sensibilité spectrale de la rétine isolée de rat albinos en stimulations monochromatiques. L'amplitude de l'onde b de l'E.R.G. est maximale au voisinage de 550 nm. Ce résultat, comparé à ceux publiés dans la littérature et obtenus sur l'animal entier, serait en rapport avec nos conditions expérimentales, intermédiaires entre l'adaptation totale à l'obscurité et l'adaptation totale au rouge (600 nm).

Nous avons également étudié les modifications de l'E.R.G. en absence de calcium dans la solution de perfusion. Nous constatons la disparition réversible de l'onde b, l'E.R.G. s'identifiant alors au potentiel tardif de récepteur, engendré par les cellules photoréceptrices. Il nous a paru intéressant de rapprocher ce comportement particulier du rôle joué par le calcium au niveau des synapses nerveuses à médiateur

chimique, Le calcium est en effet un cofacteur indispensable au fonctionnement de telles synapses, et une diminution de concentration extracellulaire en calcium inhibe la libération du médiateur chimique. Ainsi, dans le cas des photorécepteurs, l'absence de calcium dans la solution de perfusion pourrait bloquer la libération de médiateur chimique au niveau de la synapse du bâtonnet. Le seul potentiel recueilli est alors le potentiel tardif de récepteur, engendré par le photorécepteur lui-même. Ce comportement serait donc un argument en faveur de la genèse de l'onde b hors des photorécepteurs.

Enfin, nous avons réalisé une étude systématique de la variation d'amplitude de l'onde b de l'E.R.G. au cours de la survie des rétines isolées. Les courbes de variation obtenues, ou courbes de survie, peuvent être décrites en trois phases : dans un premier temps, l'amplitude de l'onde b augmente, ce qui correspondrait à une phase de récupération, c'est-à-dire à une amélioration de la survie des rétines grâce à la perfusion par le milieu enrichi ; puis, l'amplitude de l'onde b reste pratiquement constante pour enfin décroître, de manière irréversible, jusqu'à la fin de la survie. En moyenne, les rétines isolées fournissent des réponses électriques mesurables pendant trois à six heures après le début de la perfusion. Cette variation d'amplitude de l'onde b nous a conduit, pour des mesures quantitatives, à définir le protocole expérimental suivant : à intervalles de temps réguliers, nous réalisons une stimulation de référence, et l'amplitude de l'E.R.G., obtenu en réponse à une stimulation expérimentale, est exprimée par rapport à la stimulation de référence.

Lorsque les rétines isolées sont stimulées par de brèves impulsions de rayons X (80 ms), nous recueillons une réponse électrique absolument identique à celle obtenue en stimulation par la lumière visible. De plus, une observation nous a paru particulièrement importante : lorsque la rétine isolée est adaptée à la lumière, il n'est plus possible de recueillir une réponse en stimulation lumineuse, ce qui traduit le caractère scotopique de l'E.R.G. enregistré. De la même manière, en adaptation à la lumière, il n'est plus possible de recueillir une réponse de la rétine à la stimulation par les rayons X. Ce fait constitue un argument essentiel en faveur du caractère physiologique de la réponse enregistrée par stimulation par les rayons X.

Nous avons étudié la variation d'amplitude de l'onde b de l'E.R.G. en fonction de l'exposition à la rétine entre 60 mR et 230 mR. Nous retrouvons une variation linéaire de l'amplitude avec le logarithme de l'exposition à la rétine à partir d'environ 100 mR. Ce résultat est comparable à ceux obtenus par d'autres auteurs sur l'animal entier.

Pour apprécier une éventuelle altération de la survie des rétines due aux stimulations répétées par les rayons X, nous avons mis en oeuvre deux séries d'expériences. D'une part, nous avons réalisé des courbes de survie en stimulations séquentielles : les rétines sont d'abord stimulées en lumière blanche puis, lorsque la réponse se situe dans la phase ascendante de la courbe de survie, elles sont stimulées par les rayons X. Dans ces conditions, la phase de récupération est maintenue, traduisant l'absence d'altération du métabolisme rétinien. D'autre part, nous avons étudié la survie des rétines en stimulation alternée : toutes les cinq minutes les rétines sont stimulées en lumière blanche, puis une minute après, par les rayons X. Le parallélisme des deux courbes de survie ainsi obtenues met en évidence l'identité de comportement des rétines vis à vis de ces deux stimulus.

Les E.R.G., recueillis sur rétine isolée, en réponse aux rayons X, peuvent être dûs soit à une interaction directe du rayonnement incident sur la rétine, soit à une émission secondaire de photons de lumière visible. Dans nos conditions expérimentales, cette émission secondaire ne peut avoir lieu qu'au niveau du liquide de perfusion, situé de part et d'autre de la rétine. Pour mettre en évidence cette éventuelle participation du liquide de perfusion à la réponse obtenue en stimulation par les rayons X, nous avons réalisé trois expériences. Tout d'abord, nous avons apprécié la radioluminescence du liquide de perfusion en la comparant à celle d'un mélange scintillant utilisé pour les mesures de radioactivité en scintillation liquide. Les résultats obtenus dans ces conditions montrent que le liquide de perfusion est dépourvu de propriétés radioluminescentes. La deuxième série d'expériences a consisté à placer, dans le liquide de perfusion, un colorant alimentaire, le noir brillant, dans le but de rendre impossible la stimulation par la lumière visible sans affecter, à priori, la stimulation par les rayons X. En stimulation alternée, nous avons alors constaté que la présence du colorant diminue de manière importante la réponse au stimulus lumineux alors que la réponse aux rayons X est pratiquement inchangée. Enfin, nous avons mesuré la variation d'amplitude de l'E.R.G., obtenu en réponse aux rayons X, en atténuant l'exposition à la rétine de deux manières différentes : soit en augmentant la distance du tube à rayons X à la cellule de perfusion, soit en interposant, entre le tube et la cellule, des cylindres remplis de liquide de perfusion. Nous avons alors constaté que l'amplitude de l'E.R.G. est identique pour une même exposition à la rétine.

L'ensemble de ces résultats montre donc que l'E.R.G. obtenu en réponse aux rayons X n'est pas dû à une radioluminescence du liquide de perfusion mais à une interaction directe du rayonnement avec la rétine.

Nous avons alors comparé l'efficacité de la lumière visible et des rayons X pour engendrer, sur rétine isolée, un E.R.G. d'amplitude donnée. Cette étude comparative a comporté trois étapes. Tout d'abord, nous avons étudié la variation d'amplitude de l'E.R.G. en fonction de l'énergie incidente à la rétine en lumière monochromatique, à 489 nm. Nous retrouvons une variation linéaire de l'amplitude de la réponse avec l'énergie du stimulus. Puis, ayant mesuré la variation d'amplitude de l'E.R.G. en fonction de l'exposition à la rétine, nous avons estimé l'énergie incidente sur la base d'une énergie équivalente du faisceau de rayons X de 40 keV. Il nous a alors suffi de comparer les énergies des deux stimulus. Les résultats moyens ainsi obtenus montrent qu'il faut une énergie incidente à la rétine 5.10^6 fois plus grande avec des rayons X d'énergie moyenne 40 keV qu'avec des photons de lumière visible de longueur d'onde 489 nm pour obtenir, sur rétine isolée, un E.R.G. d'égale amplitude.

Cette étude électrophysiologique nous permet donc d'affirmer d'une part que les rayons X peuvent provoquer la genèse d'un E.R.G. sur rétine isolée et d'autre part que cette réponse rétinienne est due à une interaction directe du rayonnement incident avec la rétine.

Pour expliquer le mécanisme par lequel cet E.R.G. prend naissance, nous avons retenu deux hypothèses. Soit les rayons X agissent sur la membrane de l'article externe du bâtonnet. Il faudrait alors qu'ils provoquent une hyperpolarisation de cette membrane par diminution de perméabilité au sodium pour rendre compte de la genèse d'un potentiel de photorécepteur. Soit les rayons X agissent sur la rhodopsine, photopigment rétinien dont la photolyse conditionne les modifications de perméabilité membranaire du bâtonnet, responsables de la genèse de l'E.R.G. Or, les rayonnements ionisants, et en particulier les rayons X,

peuvent entraîner des variations du potentiel membranaire de repos des cellules nerveuses. Tous les auteurs s'accordent pour reconnaître d'une part que les rayons X provoquent une dépolarisation membranaire par augmentation de perméabilité au sodium et d'autre part que cette dépolarisation n'est mesurable que pour des expositions de l'ordre de 10^3 à 10^4 R.

Dans ces conditions, il nous a paru peu vraisemblable qu'au niveau de l'article externe du bâtonnet, les rayons X puissent entraîner une hyperpolarisation de sa membrane par diminution de perméabilité au sodium. Aussi, nous avons retenu la deuxième hypothèse qui nous a conduit à travailler sur la rhodopsine extraite des rétines de rats albinos.

La rhodopsine étant une protéine membranaire, il est nécessaire, pour l'extraire, d'utiliser un détergent. Nous avons adopté la méthode de COLLINS et MORTON à la digitonine à 2 %.

Les extraits de rhodopsine sont caractérisés par la mesure de leur spectre d'absorption. Celui-ci présente deux maximums principaux :

- l'un à 500 nm, caractéristique du 11-cis rétinol lié à l'opsine et qui est responsable des propriétés chromophores du photopigment.
- l'autre à 280 nm, caractéristique des acides aminés aromatiques de l'opsine : tyrosine et tryptophane.

Entre ces deux maximums, on peut noter quelquefois un léger épaulement vers 350 nm qui serait dû au 11-cis rétinol mais dont la présence est inconstante et semble étroitement liée aux conditions d'extraction.

Nous avons étudié les modifications du spectre d'absorption après décoloration de la rhodopsine par la lumière visible. Cette photolyse correspond à l'isomérisation cis→trans du rétinol suivie de la rupture de sa liaison à l'opsine, ce qui correspond, au niveau du spectre d'absorption, à la disparition du maximum à 500 nm et à l'apparition d'un maximum d'absorption à 390 nm, caractéristique du tout-trans rétinol libre.

Nous avons également étudié l'action de la chaleur sur la rhodopsine. Depuis les travaux de HUBBARD, on sait qu'à l'obscurité, par dénaturation de l'opsine, la rhodopsine est décolorée par la chaleur. En effet, l'opsine dénaturée ne peut plus maintenir sa liaison au 11-cis rétinol, qui est libéré. Toutefois, le 11-cis rétinol est, lui-même, rapidement isomérisé par la chaleur en tout-trans rétinol. Au niveau du spectre d'absorption, cette décoloration de la rhodopsine, à l'obscurité, se traduit par la disparition du maximum d'absorption à 500 nm et l'apparition du maximum à 390 nm caractéristique du tout-trans rétinol. Par ailleurs, nous avons montré, en extrapolant les données de la littérature, que l'importance de cette décoloration à 37° C pouvait rendre compte du "bruit d'obscurité" de la rétine c'est-à-dire du maintien de la rétine à un niveau donné d'excitation.

Nous avons, enfin, apprécié les modifications du spectre d'absorption de la rhodopsine après irradiation par les rayons X. Avec des expositions de l'ordre de 10^4 à 10^5 R, nous ne notons aucune variation du maximum d'absorption à 500 nm mais par contre une augmentation importante de l'absorption en ultraviolet. Pour des expositions plus élevées, de l'ordre de 10^6 R, parallèlement à cette augmentation d'absorption en ultraviolet, nous mesurons également une diminution

d'absorption à 500 nm, En moyenne, pour une exposition de $1,25.10^6$ R, la quantité de rhodopsine disparue de l'échantillon irradié est d'environ 20 %.

Cette étude spectrophotométrique permet donc de dégager les conclusions suivantes :

- A l'image de la lumière visible, les rayons X peuvent décolorer la rhodopsine : pour des expositions suffisantes, on constate, en effet, après irradiation, une diminution du maximum d'absorption à 500 nm.
- Si on compare l'énergie qu'il a fallu fournir avec les rayons X à celle qu'il aurait fallu fournir avec des photons de lumière visible pour obtenir la même décoloration de la rhodopsine, on constate que l'importance de cette décoloration par les rayons X peut expliquer la genèse d'un E.R.G. sur rétine isolée.
- Enfin, l'interprétation des modifications du spectre d'absorption de la rhodopsine après irradiation montre que, dans un premier temps, il y aurait désorganisation partielle de la molécule, vraisemblablement par rupture de liaisons faibles assurant sa conformation, puis, pour des expositions suffisantes, atteinte du site critique de la molécule, c'est-à-dire du site de fixation du rétinale à l'opsine. A l'image de l'inactivation enzymatique par les rayons X, cette atteinte du site critique pourrait être due à un transfert d'énergie de l'opsine vers le groupement chromophore.

En conclusion, nous avons montré, par étude électrophysiologique sur rétine isolée de rat albinos, que les rayons X étaient capables de provoquer la genèse d'un électrorétinogramme par interaction directe sur le tissu photorécepteur. Par étude spectrophotométrique sur la rhodopsine extraite et solubilisée, nous avons montré que les rayons X étaient capables de décolorer la rhodopsine et que l'importance de cette décoloration pouvait expliquer la genèse d'un électrorétinogramme sur rétine isolée.

Toutefois, le mécanisme d'absorption de l'énergie pourrait être différent dans le cas de la lumière visible et dans celui des rayons X :

- L'énergie apportée par les photons de lumière visible est exclusivement absorbée par le groupement chromophore de la molécule, le 11-cis rétinol. Il s'ensuit son isomérisation cis→trans qui induit, sur l'opsine, une modification de conformation responsable de l'excitation du bâtonnet.
- L'énergie apportée par les rayons X est absorbée en premier lieu, par la partie protéique de la molécule, et l'excitation du bâtonnet pourrait être due à un transfert d'énergie de l'opsine vers le chromophore.

Ce mécanisme, que nous proposons, est déduit de l'étude des modifications des propriétés spectrales du photopigment après irradiation. Il nécessite une confirmation expérimentale, en particulier par l'étude des variations de structure et des propriétés fonctionnelles du photopigment irradié. C'est l'orientation actuelle de notre recherche.

Enfin, nous pensons pouvoir utiliser ces mêmes techniques expérimentales pour l'étude du mécanisme de formation des phosphènes provoqués par d'autres catégories de rayonnements ionisants : électrons, pions, ions lourds... .

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

...the ... of the ...

